

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11316226 A

(43) Date of publication of application: 16.11.99

(51) Int. Cl

G01N 33/543
G01N 33/543
G01N 33/543
G01N 33/543
G01N 35/02

(21) Application number: 10123075

(22) Date of filing: 06.05.98

(71) Applicant: OLYMPUS OPTICAL CO
LTDWAKO PURE CHEM IND LTD
SANYO CHEM IND LTD

(72) Inventor: WATANABE HARUHISA
KOBAYASHI TAKAHISA
KUNICHlKA MAKOTO

**(54) CARTRIDGE FOR AUTOMATIC MEASUREMENT
AND AUTOMATIC MEASURING METHOD**

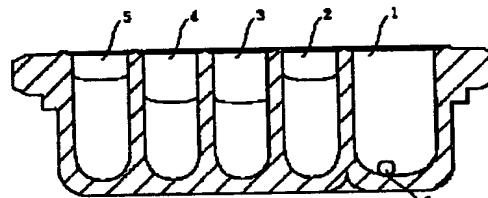
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cartridge for automatic measurement, by which a reagent can be controlled simply according to a one-specimen one-cartridge system.

SOLUTION: In a cartridge for automatic measurement, a reaction tank 1 which performs a reaction is provided, a plurality of storage tanks 2 to 5 into which a reagent for the reaction is filled are provided, and they are used so as to be built in an automatic measuring apparatus by which a component in a trace amount existing in a specimen is quantitatively determined automatically. In the cartridge for automatic measurement, an automatic measurement is composed of a specific selective reaction performed by using a specific selective reactant having specific selective reactivity with the component in the trace amount in the specimen, a reaction with a marker substance, and the measurement of the marker substance. The reaction tank 1 comprises a carrier which carries the specific selective reaction substance at its inside, and all reagents which are required for the specific selective reaction, the reaction with the marker substance and the

measurement of the marker substance are filled into the plurality of storage tanks 2 to 5 at their inside so as to be solutionlike.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-316226

(43)公開日 平成11年(1999)11月16日

(51) Int.Cl. ⁶ G 0 1 N 33/543	識別記号 5 3 1 5 1 1 5 1 5 5 7 1	F I G 0 1 N 33/543 5 3 1 5 1 1 A 5 1 5 A 5 7 1
35/02		35/02 A 審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平10-123075

(22)出願日 平成10年(1998)5月6日

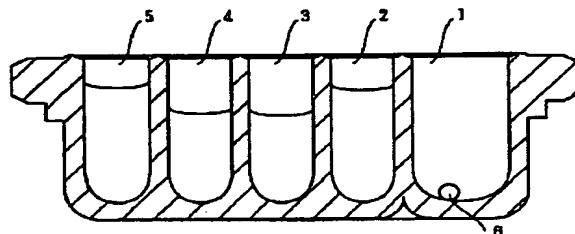
(71)出願人 000000376
オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(71)出願人 000252300
和光純薬工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(71)出願人 000002288
三洋化成工業株式会社
京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(72)発明者 渡辺 晴久
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内
(74)代理人 弁理士 安富 康男 (外2名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 自動測定用カートリッジ及び自動測定法

(57)【要約】

【課題】 一検体一カートリッジ方式で試薬管理が簡便にできる自動測定用カートリッジを提供する。

【解決手段】 反応を行う反応槽と、上記反応に用いる試薬を充填するための複数の格納槽とを有し、検体中に存在する微量成分を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジであって、上記自動測定は、上記検体中の微量成分との特異選択性を有する特異選択性の反応物質を用いて行う特異選択性の反応と、標識物質との反応と、標識物質の測定とからなるものであり、上記反応槽は、その内部に、上記特異選択性の反応物質を担持した担体を有するものであり、上記複数の格納槽は、その内部に、独立して、上記特異選択性の反応と、上記標識物質との反応と、上記標識物質の測定と、に必要な試薬のすべてを溶液状にして充填してなるものである自動測定用カートリッジ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 反応を行う反応槽と、前記反応に用いる試薬を充填するための複数の格納槽とを有し、検体中に存在する微量成分を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジであって、前記自動測定は、前記検体中の微量成分との特異選択性を有する特異選択性の反応物質を用いて行う特異選択性の反応と、標識物質との反応と、標識物質の測定とからなるものであり、前記反応槽は、その内部に、前記特異選択性の反応物質を担持した担体を有するものであり、前記複数の格納槽は、その内部に、独立して、前記特異選択性の反応と、前記標識物質との反応と、前記標識物質の測定と、に必要な試薬のすべてを、溶液状にして充填してなるものであることを特徴とする自動測定用カートリッジ。

【請求項2】 担体は、直径2.0~4.0mmのピ-ズである請求項1記載の自動測定用カートリッジ。

【請求項3】 特異選択性的反応及び標識物質との反応は、サンドイッチアッセイであるか、又は、競合反応アッセイである請求項1又は2記載の自動測定用カートリッジ。

【請求項4】 特異選択性の反応及び標識物質との反応は、酵素免疫測定である請求項3記載の自動測定用カートリッジ。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか記載の自動測定用カートリッジを用いることを特徴とする自動測定法。

【請求項6】 生体試料中の測定対象物に対して特異的に結合し得る性質を有する物質が担持された不溶性担体が収納されたウェルと、前記測定対象物の測定に必要な液状の試薬が収納されたウェルとが、一体的に形成されてなることを特徴とする生体試料測定用カートリッジ。

【発明の詳細な説明】

[0 0 0 1]

【発明の属する技術分野】本発明は、検体中に存在する微量成分を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジ、及び、この自動測定用カートリッジを用いる自動測定法、並びに、生体試料測定用カートリッジに関する。

[0 0 0 2]

【従来の技術】ヒトの血液等の体液中の微量成分を定量することにより、病気の診断や治療に役立たせようとするいわゆる診断薬の分野において、従来から、種々の特異選択性の反応が利用されている。このような特異選択性の反応は、血液等の体液を検体とし、この中に存在する蛋白質等の微量成分の量を測定することを目的とするものであり、例えば、抗原抗体反応等が挙げられる。また、このような抗原抗体反応と発色等の測定に必須の反応とを組み合わせることにより、いわゆる免疫測定法等が行われている。

【0003】このような免疫測定法の中でも、酵素免

2

疫測定法 (E I A) 及び放射免疫測定法 (R I A) は、高感度な測定法として汎用されている。E I AやR I Aは、検体中の測定対象物に対して特異選択的反応性を有する物質を担体に担持させ、かかる後にこの担体を含有する液と検体液とを接触させることにより、特異選択的反応を生じせしめて測定対象物を担体に固定させ、その後検体液を担体と分離せしめて、当該分離した担体部分を酵素により又は放射線により定量的に測定しうる方法で測定しようとするものである。

10 【0004】近年、この分野での改良が進み、現在では免疫測定法の工程のすべてを自動的に行う自動測定法が盛んになってきている。また、このような自動測定法においては、担体をビーズ等の固体とする固相法が汎用されている。

【0005】特開平63-281053号公報には、繊維状のマトリックスを有する反応ウェル、試料ウェル等の複数のウェルを有する容器を用いて行う固相法による自動免疫測定法が開示されている。しかしながら、この方法においては、使用するカートリッジのほかに、免疫測定に必要な試薬を供給する装置が必須であり、測定対象となる物質の変更に伴って供給試薬を変更する必要となり、自動化のための装置の構成が複雑になる問題があつた。

【0006】特開平4-218775号公報には、複数の開口を有し、少なくとも開口のひとつが固相を有する容器を用いた自動免疫測定法が開示されている。しかしながらこの技術は、本来的に固相が磁性粒子であって汎用性に乏しい欠点があるうえ、必ずしも操作性が良好なものではなかった。

30 【0007】従来の方法はいずれも、複数のウェルを有する容器を用いる免疫測定法であり、測定の自動化を目的としたものである。しかしながら、これらの方は、容器中に測定に必要な試薬を一部しか保有していないか、全く保有していないため、容器とは別に、測定に必要な試薬を別途用意する必要があり、自動化にあたっても装置の構成が複雑になる等の問題があった。

[0008]

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記に鑑み、自動測定装置に組み込むための自動測定用カートリッジであって、一検体一カートリッジ方式で試薬管理が簡便にできる自動測定用カートリッジを提供することを目的とするものである。

[0009]

【課題を解決するための手段】本発明は、反応を行う反応槽と、上記反応に用いる試薬を充填するための複数の格納槽とを有し、検体中に存在する微量成分を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジであって、上記自動測定は、上記検体中の微量成分との特異選択性を有する特異選択性の反応物

50 質を用いて行う特異選択的反応と、標識物質との反応

と、標識物質の測定とからなるものであり、上記反応槽は、その内部に、上記特異選択的反応物質を担持した担体を有するものであり、上記複数の格納槽は、その内部に、独立して、上記特異選択的反応と、上記標識物質との反応と、上記標識物質の測定と、に必要な試薬のすべてを溶液状にして充填してなるものであることを特徴とする自動測定用カートリッジである。本発明は、生体試料中の測定対象物に対して特異的に結合し得る性質を有する物質が担持された不溶性担体が収納されたウェルと、前記測定対象物の測定に必要な液状の試薬が収納されたウェルとが、一体的に形成されてなることを特徴とする生体試料測定用カートリッジである。以下に本発明を詳述する。

【0010】本発明は、検体中に存在する微量成分を自動的に定量する自動測定装置に組み込んで用いる自動測定用カートリッジである。上記自動測定用カートリッジの形状は、反応槽と複数の格納槽とを有していれば特に限定されず、例えば、反応槽と複数の格納槽とが並列的に並んで存在する舟型のもの等が挙げられる。

【0011】上記自動測定用カートリッジの大きさは特に限定されないが、自動測定装置に組み込んで用いるためには、より小型であることが好ましく、例えば、長さ1~10cm、高さ0.5~5cm、厚さ0.3~3cm程度のもの等が挙げられる。

【0012】上記反応槽と複数の格納槽の大きさや形状は、後述するような反応及び試薬の格納を行うことができるものであれば特に限定されないが、例えば、直径1~10mm程度の円筒型のものや直方体型のもの等が好ましい。これらは、上記カートリッジを穿つようにして構成することができる。

【0013】上記自動測定用カートリッジの反応槽と格納槽とは、異物の混入を避けるためには、その上部をシールされていることが好ましく、このようなシールとしては、例えば、アルミニウム箔や高分子フィルム等を、例えば、ホットメルト型接着剤でカートリッジ上部表面に接着させたもの等が挙げられる。アルミニウム箔によるシールは、自動測定装置に備えられたブレイカー等により容易に破れることができ、かつ密封性も良好であることから好ましい。本発明の生体試料成分測定用カートリッジの形状は特に限定されるものではなく、カートリッジ中のウェルは、一列に並んで形成されていてもよく、また円状の断面を有するカートリッジ本体中に均等に並んで形成されていてもよい。この場合において、ウェル自体の形状は、円筒状でも角柱状でもよく、底面は円弧状でも角状でもよい。本発明の生体試料成分測定用カートリッジにおいては、生体試料中の測定対象物に対して特異的に結合し得る性質を有する物質が担持された不溶性担体が収納されたウェルにおいて進行する反応を外から観察するため、該ウェルの側面の少なくとも一部に該当するカートリッジ部分が透明な材質の物質で形

成されていることが望ましい。

【0014】上記自動測定用カートリッジの素材としては、特に限定されないが、例えば、ポリスチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂等の安価で成形の容易なもの等が挙げられ、例えば、後に詳述する酵素免疫測定法で酵素活性を比色法で測定する場合には、透明なポリスチレン樹脂を用いて直接分光密度計で吸光度を測定できるようにすることができるし、光電子増幅管(フォトマルチレイヤー)を用いる場合には、光子が通過することができる素材であればすべての素材を用いることができる。

【0015】本発明の自動測定用カートリッジが適用される自動測定は、検体中の微量成分との特異選択的反応性を有する特異選択的反応物質を用いて行う特異選択的反応と、標識物質との反応と、標識物質の測定とからなるものである。

【0016】上記検体とは、例えば、ヒトの血液等の体液等が挙げられる。上記微量成分とは、定量することによりヒトの病気の診断・治療に役立てることができるものであり、例えば、テオフィリン、フェニトイン、バルプロ酸等の薬剤；サイロキシン、エストロゲン、エストラジオール等の低分子ホルモン；PSA、CEA、AFP、CA19-9等の癌マーカー；HIV、ATLA、HBV等のウイルス；甲状腺刺激ホルモン、インシュリン等の高分子ホルモン；IL-1、IL-2、IL-6等のサイトカイン；EGF、PDGF等のグロースファクター；上記ウイルスの適当なDNA、RNA等が挙げられる。

【0017】上記微量成分との特異選択的反応性を有する特異選択的反応物質とは、例えば、これら微量成分に対する抗体、抗原及びレクチン、アビジン、ビオチン等の特異的な結合を生じる物質、相補的な遺伝子断片等が挙げられ、従って、上記特異選択的反応とは、例えば、これらと微量成分との抗原抗体反応等が挙げられる。

【0018】本発明において、上記特異選択的反応とは、単に单一の反応である場合に限定されず、例えば、上記微量成分を特異的に認識する特異選択的反応物質1と、上記特異選択的反応物質1を特異的に認識する特異選択的反応物質2とを組み合わせて用いることも可能である。例えば、上記微量成分を認識する抗体1と抗体1のFc部分を認識する抗体2との組み合わせ、微量成分を認識する抗体にビオチンを結合したものとアビジンとの組み合わせ等を挙げることができる。この場合、特異選択的反応物質2を担持した担体に更に特異選択的反応物質1を反応させた物をあらかじめ反応槽に充填しておいてもよく、特異選択的反応物質1を溶液状試薬とし、特異選択的反応物質2を有する担体との反応を、上記特異選択的反応の一部分とすることもできる。

【0019】上記特異選択的反応物質としては、上記微量成分との特異選択的反応性を有するものであれば特に

限定されず、例えば、上に例示した微量成分の抗体等が挙げられ、これらの抗体はモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよく、さらに抗体の分解物である $F(ab') 、 Fab' 、 Fab 等であってもよい。上記標識物質とは、特異選択的反応により生じる反応物と特異的又は競合的に反応する物質であって、かつ、内部に検出可能な標識体を有する物質を意味する。上記標識物質としては、例えば、特異的反応物質と標識体との結合物、測定対象物と同じ物質と標識体との結合物等を挙げることができる。上記特異選択的反応により生じる反応物と特異的又は競合的に反応する標識体であれば、それ自体を標識物質として用いることもできる。$

【0020】本発明において、上記自動測定は、上記特異選択的反応と、標識物質との反応と、標識物質の測定とからなる。上記特異選択的反応及び標識物質との反応は、特に限定されず、例えば、上記特異選択的反応が抗原検体反応等の免疫反応である場合には、サンドイッチアッセイ、競合反応アッセイ等が挙げられる。本発明の生体試料測定用カートリッジは、例えば、適用する特異選択的反応及び標識物質との反応が競合法である場合には、(a) 生体試料中の測定対象物に対して特異的に結合し得る性質を有する物質が担持された不溶性担体が収納されたウェル、(b) 標識された測定対象物を含む液状試薬(例:バッファー溶液)が収納されたウェル、(c) 標識された測定対象物を含む液状試薬(例:バッファー溶液)が収納されたウェル、が一体的に形成されてなるカートリッジ(A1)等を挙げることができ、適用する特異選択的反応及び標識物質との反応がサイドイッチ法である場合には、(a) 生体試料中の測定対象物に対して特異的に結合し得る性質を有する物質が担持された不溶性担体が収納されたウェル、(b) 標識された測定対象物と特異的に結合し得る性質を有する物質を含む液状試薬(例:バッファー溶液)が収納されたウェル、(c) 標識物質の基質を含む液状試薬(例:バッファー溶液)が収納されたウェル、が一体的に形成されてなるカートリッジ(A2)等を挙げることができる。上記(A1)及び(上記(A2)において、更に2種以上の基質のそれを別個のウェルに収納するために、更に1又はそれ以上のウェルを形成させたカートリッジ(A3)等を挙げることができる。上記(A1)、上記(A2)、上記(A3)において、生体試料の希釈液(生理食塩水、バッファー等)を収納するために、更に別個のウェルを形成させたカートリッジ(A4)等を挙げができる。

【0021】上記サンドイッチアッセイの場合であっても、競合反応アッセイの場合であっても、上記微量成分との特異選択的反応性を有する特異選択的反応物質は、担体に担持されて反応に供することができる。本発明においては、上記担体は、上記反応槽の内部に存在する。

上記担体は、固体であることが好ましく、より好ましくは、ビーズであり、更に好ましくは、ガラス製又はポリスチレン製のビーズである。従って、上記「担体」とは、「固相化試薬」と称することもできるものであるし、上記「担持」とは、「固相化」と称することもできるものである。また、上記担体は、反応槽の内壁の底面及び/又は側面に、被覆処理されてなるものであってもよい。

【0022】上記ビーズは反応槽内に保有されるため、ビーズの大きさが上記自動測定用カートリッジの大きさに影響を与え、多数の検体を連続して測定する自動測定法では、カートリッジが小型であれば測定に必要な多数のカートリッジを設置するための場所が小さくてすみ、ひいては装置の小型化を可能とすることができる。しかしひビーズが小さすぎると、担持させる特異選択的反応物質の量が制限され、測定感度の低下など測定性能上の問題が生じる。従って、カートリッジを小型に維持し、性能を保証するためにはビーズの大きさが重要である。

【0023】上記ビーズの大きさとしては、一般のビペット先端の吸引口の孔径0.1~1.5mmよりも大きな直径であって、直径2.0~4.0mmが好ましく、より好ましくは直径3.0~3.4mmである。また、上記ビーズは、浮遊性のものよりも沈降性であるものの方が、反応面積が大きく、しかも洗浄時の吸引妨害にもならないという点で好ましい。上記ビーズに上記担体を担持させる方法としては特に限定されず、例えば、従来公知の物理吸着法又は化学結合法等が使用できる。上記特異選択的反応物質を担持させた上記ビーズは、乾燥状態で反応槽内に保持されるのが、操作性の点で好ましい。

【0024】本発明の自動測定用カートリッジの複数の格納槽は、その内部に、独立して、上記サンドイッチアッセイ、競合反応アッセイ等の特異選択的反応及び標識物質との反応に必要な試薬のすべてが溶液状にして充填されている。上記「独立して」とは、複数の格納槽のそれぞれに、一つずつ別個の試薬が充填されていてもよく、一つの格納槽に複数の試薬が充填されていてもよく、更には、何も充填されていない格納槽が存在していてもよい。また上記格納槽中に充填される試薬の配列を、同一の測定対象に対しては同一の配列とすることにより、複数の測定対象に対しても自動測定装置を変更することなく適用することができる。

【0025】しかしながら、上記複数の格納槽には、特異選択的反応及び標識物質との反応に必要な試薬のすべてが充填されており、上記格納槽内に存在する試薬によって一連の特異選択的反応及び標識物質との反応が完結することができる点に本発明の要旨がある。更に、上記複数の格納槽に充填される試薬は、すべて溶液状にして充填されている点にも本発明の要旨がある。

【0026】上記特異選択的反応及び標識物質との反応

としては特に限定されず、従来公知のすべての反応を適宜選択して用いることができる。以下にこの反応を、酵素免疫測定を例にして説明する。

【0027】本発明の自動測定用カートリッジの反応槽には、適切な方法により、検体液が導入される。上記検体液は、既に上述したようにヒトの血液等である。上記検体液中に存在する微量成分は、上記特異選択的反応物質を担持した担体（ビーズ）と接することにより、上記反応槽内において、特異選択的反応を生じる。

【0028】上記特異選択的反応が抗原抗体反応であり、サンドイッチアッセイである場合には、抗体が結合したビーズの表面において、抗体と微量成分である抗原とが反応して結合する。

【0029】上記特異選択的反応を良好に進行させるためには、上記検体のほか、上記反応槽内に緩衝液を導入することが好ましい。本発明においては、上記緩衝液は、反応に必要な試薬として、上記格納槽内に充填させておく。上記緩衝液としては特に限定されず、通常抗原抗体反応等に用いられる緩衝液を用いることができ、例えば、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液等が挙げられる。

【0030】上記特異選択的反応が終了した後、上記検体液と上記緩衝液との残留混合物は、例えば、アスピレーター等により反応槽外に排除される。その後、担体（ビーズ）は、洗浄液等により洗浄されることが好ましい。上記洗浄液については、本発明の自動測定用カートリッジのいずれかの場所に納めた実施形態とすることも可能であるが、このような洗浄液は、大量であることが通常であり、かつ、測定対象となる微量成分の種類によって変える必要がない物質であるので、本発明の自動測定用カートリッジ内に納めることなく、自動測定装置の一部の装置から供給されることが好ましい。上記洗浄液としては上記特異選択的反応等に影響を与えないものであれば特に限定されず、例えば、生理食塩水、脱イオン水等が挙げられる。

【0031】上記洗浄の後、反応槽内には、酵素免疫測定法の場合には、特異選択的反応物質と酵素の結合に用いる酵素及び上記酵素の基質を導入する。上記酵素及び上記酵素の基質もまた、反応に必要な試薬として、上記格納槽内に充填させておく。

【0032】上記酵素及び上記酵素の基質としては特に限定されない。例えば、酵素としてペルオキシダーゼを選択した場合、上記酵素の基質としては、例えば、ABTS、TMB、ルミノール類／過酸化物等が挙げられる。上記酵素として、例えば、アルカリフェヌルオキシダーゼを選択すれば、基質はローニトロフェニルフェヌルオキシダーゼ、4-MUP、AMPD等が使用できる。

【0033】なかでも、好ましくは、酵素活性を発光量で検出するペルオキシダーゼ、ルミノール類／過酸化物の組み合わせである。この場合、ルミノール類として

は、ルミノール、ルミノールの塩、イソルミノール等が挙げられ、過酸化物としては、過酸化水素が好ましい。

【0034】上記特異選択的反応物質と酵素の結合体を作製するにあたり、用いる特異選択的反応物質は、ビーズに結合させた特異選択的反応物質と同じであっても、異なっていても良く、測定対象物質（微量成分）により自由に決定できる。上記特異選択的反応物質と酵素の結合方法は従来公知の方法で行うことができ、例えば、「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37～45ページ（1987）記載の方法等が挙げられる。

【0035】本発明においては、上記格納槽内に充填する試薬（複数）は、それぞれ溶液状である。溶液状としているために、格納槽から反応槽への導入が、単一の操作で簡便に行うことができる。

【0036】上記試薬としては、例えば、酵素免疫測定法の場合には、酵素活性を比色で検出する2ステップ2抗体酵素免疫測定法を例にすると、（1）1ステップめの反応に用いる緩衝液、（2）酵素標識抗体である特異選択的反応物質と酵素との結合体を溶解した溶液、

20 （3）酵素の基質を溶解した溶液、の3種類となる。

【0037】本発明においては、上記3種類のすべてを溶液状試薬として、格納槽のそれぞれに入れることができが、任意の1種以上を溶液状試薬として格納槽に充填することもできる。

【0038】上記格納槽の数は、溶液状試薬の数、操作性及び簡便性により適宜決めることができるが、通常、2～10、より好ましくは、2～7、更に好ましくは、3～6である。本発明の特異選択的反応及び標識物質との反応を、酵素活性を比色で検出する2ステップ2抗体

30 酵素免疫測定法で行い、溶液状試薬を3種類とした場合、格納槽1には、ワンステップめの反応に用いる緩衝液を充填し、格納槽2には、酵素と特異選択的反応物質の結合体を充填し、格納槽3には、酵素の基質を充填する形態をとることができる。

【0039】ここで、酵素と特異選択的に反応する物質の結合体と上記担体とは、検体と同時に反応させるようなワンステップ法で反応させてもよく、この場合には担体を充填する槽と同じ槽、好ましくは反応槽に酵素特異選択的反応物質の結合体を充填してもよい。また更に、

40 空の格納槽を用意し、測定する検体を入れる場所や検体を希釈するために使用することもできる。

【0040】

【発明の実施の形態】以下に図面を参照して本発明を詳細に説明する。図1は本発明の自動測定用カートリッジの構成を示す一例である。本発明を実施するにあたり使用するカートリッジは、反応槽（1）、溶液状試薬が充填された格納槽1、2、3、4（2、3、4、5）を備えている。

【0041】反応槽（1）は、抗体を結合したビーズ

50 （6）が入っており、反応、B/F分離（固相と液相と

の分離)及び検出を行う。上記検出は、本発明の自動測定用カートリッジの外から、例えば、分光光度計等を当てて測定することにより行うことができる。格納槽1(2)には緩衝液が入っている。格納槽2(3)にはペルオキシダーゼ標識抗体が、格納槽3(4)にはルミノールが、格納槽4(5)には過酸化水素が入っている。

【0042】本発明の自動測定用カートリッジを用いて測定をする場合には、一定量の検体を反応槽(1)に分注し、また必要に応じて格納槽1(2)から緩衝液を反応槽(1)に分注して反応させる。反応後、B/F分離を行い、格納槽1(2)から反応槽(1)にペルオキシダーゼ標識抗体を分注する。反応後、B/F分離を行い、格納槽2(3)及び格納槽3(4)から反応槽(1)へ、ルミノール、過酸化水素を分注し、ペルオキシダーゼ活性を発光量として検出する。発光量は反応槽(1)の側面等から直接、光電子増倍管等により検出することができる。

【0043】以上で説明したそれぞれの操作を装置により自動化して連続して検体を測定する自動測定法を実施することが可能である。操作を装置により自動化する方法及び装置の構成は、測定の目的、カートリッジの形状等に合わせて自由に実施することができ、特に制限はない。

【0044】本発明は、自動化に適した自動測定用カートリッジを提供するものである。すなわち、固相としてピペットに吸入されない大きさのビーズを用いることにより、磁性粒子や他の微粒子を用いた場合に必要な特別な機構(磁石の移動、濾過等)が不要である。さらに、固相以外の試薬を全て溶液状試薬とすることにより、試薬の調製を不要とした。また装置での試薬の分注、除去等が簡便な機構で行うことができ、溶液状でない試薬では自動化は困難である欠点をみごとに解決することができる。

【0045】本発明によれば、特異選択的反応が行われる部分が固相であり、上記固相は、例えば、ビーズであり、反応に必要なすべての試薬は溶液状であり、それらのすべてが一つのカートリッジ内に納められているので、一つの測定対象物質に対して、一つのカートリッジですべて対応することができる。従って、試薬の無駄がなくなり、試薬管理が極めて簡便で容易となる。

【0046】また、測定対象が変更されることに試薬を調製する必要性がなく、測定対象物質を決定すると同時に用いるカートリッジを決定すればよく、例えば、HIV用カートリッジ、PSA用カートリッジというように、測定対象物質ごとにカートリッジを独立して作製し、適用することができるので、試薬混同に基づく測定*

反応槽：抗体ビーズ

格納槽1：1% BSA含有リン酸緩衝液

格納槽2：ペルオキシダーゼ標識抗体液

格納槽3：ルミノール溶液

*誤認が皆無となる。また、本発明によれば、カートリッジを変更するだけで全く同一の自動測定装置を用いて多種多様の測定対象物質を効率よく測定することができる。本発明の自動測定用カートリッジを用いた自動測定法は、上記したように優れた特徴を有するものであり、当該自動測定法もまた、本発明の一つである。

【0047】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに説明するが本発明はこれに限定されるものではない。

10 【0048】実施例1

下記のようにして本発明の自動測定用カートリッジを作製した。

1) 抗A FP ポリクローナル抗体結合ビーズの調製

抗A FP ポリクローナル抗体(ダコジャパン社製)をpH 9の0.1M炭酸緩衝液に20 μg/mlの濃度で溶解した。直径3.2mmのポリスチレンビーズ(イムノケミカル社製)を加え、48時間反応させたのち、0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液でコーティングし、凍結乾燥した。このものを、図1に示したカートリッジの反応槽(1)中に充填した。

【0049】2) ペルオキシダーゼ標識抗A FP ポリクローナル抗体の調製

抗A FP ポリクローナル抗体(ダコジャパン社製)、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(東洋紡績社製)を用い、文献【エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール；ジェイ・バイオケム、Vol. 92(1982) 1413-1424】に記載の方法でペルオキシダーゼ標識抗A FP ポリクローナル抗体を調製した。使用時に1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液で希釈して使用した。

【0050】3) ルミノール溶液の調製

ルミノール(東京化成社製)0.18g及び4-(シアノメチルチオ)フェノール0.1gを0.1M(モル/l)、pH 8.5のトリス/塩酸緩衝液1リットルに溶解した。使用するまで遮光、冷蔵保存した。

【0051】4) 過酸化水素水の調製

200 μlの35%過酸化水素水を脱イオン水1リットルに溶解し、過酸化水素水とした。使用するまで冷蔵保存した。

40 【0052】5) カートリッジ試薬の調製

ポリプロピレンで作製された図1に示したカートリッジの格納槽2(3)、格納槽3(4)及び格納槽4(5)に上記2)、3)及び4)で作製した3種類の試薬を分注した後、反応槽の上部とともに、各格納槽の上部を、PETをラミネートされたアルミホイルでヒートシールした。分注位置及び分注量は次の通りであった。

1ヶ

200マイクロリットル

200マイクロリットル

200マイクロリットル

格納槽4：過酸化水素水

【0053】実施例2

実施例1で作製した自動測定用カートリッジを用い、マニュアルで免疫測定を行った。次の操作で、既知濃度の AFP 標準品を測定し、検量線を作製した。

1) 反応操作

シールブレーカーで反応槽及び各格納槽（1～5）の上部シールを破った後、格納槽1（2）に AFP を含む検体を 20 マイクロリットルをピペットで加え、吸排操作を行い均一に混合した。格納槽1（2）中の混合液 15 0 マイクロリットルを反応槽（1）に分注し、37℃で 10 分間反応させた。反応槽（1）中の溶液を吸排操作により除去し、その後、生理食塩水 500 マイクロリットルを注入して、ビーズを 3 回洗浄した後、格納槽2（3）中の標識抗体 150 マイクロリットルを反応槽（1）に分注し、37℃で 10 分反応させた。反応槽（1）中の溶液を吸排操作により除去し、その後、生理食塩水 500 マイクロリットルでビーズを 3 回洗浄した後、格納槽3（4）及び格納槽4（5）から、ルミノール溶液及び過酸化水素水それぞれ 100 マイクロリットルを反応槽（1）に添加し、添加後 40 秒～45 秒における発光量を、反応槽（1）の側面から、ルミノメーターで測定した。

2) 結果

結果を図 2 に示した。良好な検量線が得られた。

【0054】実施例3

実施例1で作製した自動測定用カートリッジを用いて、実施例2の測定操作を自動化した自動測定装置を用いて血清 100 検体を連続して測定した。実施例1で作製した自動測定用カートリッジ及び血清検体を入れた容器を自動測定装置にそれぞれ 100 個セットし、連続して自*

10 【0055】

【発明の効果】本発明によれば、測定に必要な試薬が一つのカートリッジに封入されているため、装置による測定の自動化が実施しやすく、簡便で迅速な測定が可能となり、臨床検査の分野に大きな貢献をする。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の自動測定用カートリッジの一実施形態を示す断面概略図である。

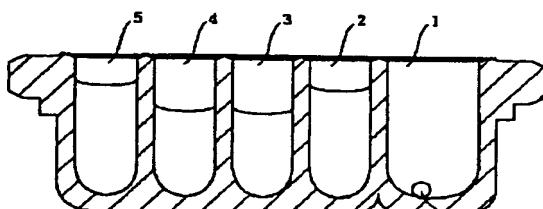
【図2】実施例2で得られた AFP 測定の検量線である。縦軸は、ルミノメーターの発光量 (cps) を示し、横軸は、 AFP 濃度 (ng/ml) を示す。

【図3】本発明の自動測定用カートリッジを用いた自動測定装置による AFP 測定の結果 (縦軸) をマニュアル測定 (横軸) と比較した相関図である。

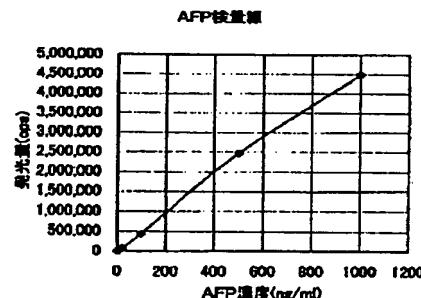
【符号の説明】

- 1 反応槽
- 2 格納槽1
- 3 格納槽2
- 4 格納槽3
- 5 格納槽4
- 6 ビーズ

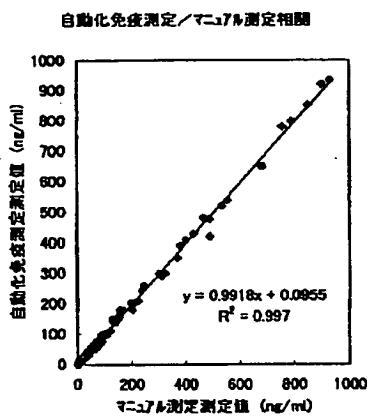
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 小林 高久

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業
株式会社大阪研究所内

(72)発明者 國近 誠

京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋
化成工業株式会社内